

# VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

## PCT



### INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT (Artikel 36 und Regel 70 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts 0000054204	<b>WEITERES VORGEHEN</b> siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsberichts (Formblatt PCT/PEA/416)	
Internationales Aktenzeichen PCT/EP 03/14880	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 24.12.2003	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 08.01.2003
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK C12N1/04, C12N9/96, C12N9/78, C12N9/88		
Anmelder BASF AKTIENGESELLSCHAFT et al.		

1. Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.
2. Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 5 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.
- ☒ Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).
- Diese Anlagen umfassen insgesamt 3 Blätter.

3. Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:

- I ☒ Grundlage des Bescheids
- II ☐ Priorität
- III ☐ Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
- IV ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
- V ☒ Begründete Feststellung nach Regel 66.2 a)ii) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
- VI ☐ Bestimmte angeführte Unterlagen
- VII ☐ Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
- VIII ☐ Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags  13.05.2004	Datum der Fertigstellung dieses Berichts  25.05.2005
Name und Postanschrift der mit der internationalen Prüfung beauftragten Behörde   Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Bevollmächtigter Bediensteter  Lanzrein, M  Tel. +49 89 2399-7358 

**I. Grundlage des Berichts**

1. Hinsichtlich der **Bestandteile** der internationalen Anmeldung (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigelegt, weil sie keine Änderungen enthalten (Regeln 70.16 und 70.17)*):

**Beschreibung, Seiten**

1-23 in der ursprünglich eingereichten Fassung

**das Sequenzprotokoll in der Beschreibung, Seiten**

1-3 in der ursprünglich eingereichten Fassung

**Ansprüche, Nr.**

1-14 eingegangen am 09.03.2005 mit Schreiben vom 09.03.2005

**Zeichnungen, Blätter**

1/2-2/2 in der ursprünglich eingereichten Fassung

2. Hinsichtlich der **Sprache**: Alle vorstehend genannten Bestandteile standen der Behörde in der Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht worden ist, zur Verfügung oder wurden in dieser eingereicht, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

Die Bestandteile standen der Behörde in der Sprache: zur Verfügung bzw. wurden in dieser Sprache eingereicht; dabei handelt es sich um:

- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen Recherche eingereicht worden ist (nach Regel 23.1(b)).
- ☐ die Veröffentlichungssprache der internationalen Anmeldung (nach Regel 48.3(b)).
- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung eingereicht worden ist (nach Regel 55.2 und/oder 55.3).

3. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale vorläufige Prüfung auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das:

- ☐ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.
- ☐ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.
- ☐ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfassten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

4. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

- ☐ Beschreibung, Seiten:

# INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP 03/14880

- ☐ Ansprüche, Nr.:  
☐ Zeichnungen, Blatt:

5. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)).

*(Auf Ersatzblätter, die solche Änderungen enthalten, ist unter Punkt 1 hinzuweisen; sie sind diesem Bericht beizufügen.)*

6. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

## V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Feststellung
- |                                |                           |
|--------------------------------|---------------------------|
| Neuheit (N)                    | Ja: Ansprüche 1, 5        |
|                                | Nein: Ansprüche 2-4, 6-14 |
| Erfinderische Tätigkeit (IS)   | Ja: Ansprüche 1, 5        |
|                                | Nein: Ansprüche 2-4, 6-14 |
| Gewerbliche Anwendbarkeit (IA) | Ja: Ansprüche: 1-14       |
|                                | Nein: Ansprüche:          |

2. Unterlagen und Erklärungen:

**siehe Beiblatt**

**Zu Punkt V**

**Begründete Feststellung hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung**

1. Die vorliegende Anmeldung betrifft ein Verfahren zur Konservierung/Stabilisierung von Mikroorganismen, welche Nitrilhydratase oder Nitrilase Enzymaktivität aufweisen. Dabei wird ein Aldehyd, vorzugsweise Benzaldehyd (Beispiel 3) oder 2-Chlorbenzaldehyd (Beispiel 4), als Stabilisator verwendet.
2. D1: US-A-4 900 672 (YAMADA HIDEAKI ET AL) 13. Februar 1990 (1990-02-13)  
D2: DE 198 48 129 A (BASF AG) 20. April 2000 (2000-04-20)
3. Neuheit
  - 3.1 D1 offenbart eine Methode zur Konservierung der Nitril-Hydratase Aktivität in Pseudomonas. Als Stabilisatoren sind u.a. Glyoxalsäure oder andere Säuren mit Aldehydgruppen vorgeschlagen (Spalte 2, Zeile 65 - Spalte 3, Zeile 42; Anspruch 5). Ausserdem sind als stabilisierende Zusätze Nitrile und Cyanidverbindungen vorgeschlagen (Spalte 3, Zeile 2 sowie Zeile 17). Die Verbindungen können als Stabilisatoren alleine oder in Kombination verwendet werden (Spalte 2, Zeile 68). Der konservierende Effekt der Glyoxalsäure ist gezeigt (Tab. 3). Die Bakterienzellen können dabei in Suspension oder immobilisiert sein.  
Im Lichte von D1 sind die Ansprüche 2-4, 6-8, 13, 14 nicht neu, denn Glyoxalsäure und andere Säuren mit Aldehydgruppen wie in D1 (Spalte 3, Zeilen 28-29) offenbart, fallen unter die Definition von Anspruch 2 ("substituiertes oder unsubstituiertes (...) C1-C10-Alkyl").  
Ausserdem sind die Ansprüche 9-12 nicht neu da sie sich auf eine Zubereitung mit Nitril-Hydratase beziehen.
  - 3.2 Der Anspruch 13 ist ausserdem nicht neu gegenüber D2, denn darin ist auch die Zugabe von Aldehyden zum Reaktionsgemisch vorgeschlagen, jedoch nicht zum

Zweck der Konservierung der Enzymaktivität (Seite 5, Zeile 13 - 18; Anspruch 12). Das Merkmal "Lagerung bis zum Einsatz gemäss Schritt c)" ist jedoch nicht geeignet, den Gegenstand des Anspruches 13 gegenüber D2 abzugrenzen, denn der Begriff "Lagerung" ist unklar hinsichtlich einer Zeitlimite.

- 3.3 Anspruch 5 bezieht sich spezifisch auf substituierte oder unsubstituierte Benzaldehyde, die noch in keinem der zitierten Dokumente als Stabilisatoren offenbart wurde. Der Anspruch ist deshalb neu.

Die Konservierung der Nitrilase Enzymaktivität wurde in D1 nicht offenbart. Anspruch 1 ist deshalb als neu anzusehen.

#### 4. Erfinderische Tätigkeit

Da in den zitierten Dokumenten niemals vorgeschlagen wurde, Benzaldehyde zur Stabilisierung von in Mikroorganismen enthaltenen Enzymen zu verwenden, ist der Anspruch 5 als erfinderisch anzusehen.

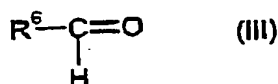
Obschon die Verwendung von Aldehyden für die Stabilisierung von Nitril-Hydratase bekannt ist (D1), ist es nicht als naheliegend zu anzusehen, dass dieses Konservierungsverfahren auch auf die Nitrilase-Enzymaktivität anwendbar ist. Deshalb erfüllt der Anspruch 1 die Erfordernisse von Art. 33(3) PCT hinsichtlich der erfinderischen Tätigkeit.

## Patentansprüche

JC14 Rec'd PCT/PTO 05 JUL 2005

1. Verfahren zur Konservierung und/oder Lagerung von Mikroorganismen, die mindestens eine Nitrilase-Enzymaktivität aufweisen, wobei die Konservierung und/oder Lagerung in einem wässrigen Medium erfolgt, welches mindestens ein Aldehyd umfasst, wobei die Gesamtaldehydkonzentration in einem Bereich von 0,1 bis 100 mM/l liegt.

2. Verfahren zur Konservierung und/oder Lagerung von Mikroorganismen, die mindestens eine Nitrilhydratase- oder Nitrilase-Enzymaktivität aufweisen, wobei die Konservierung und/oder Lagerung in einem wässrigen Medium erfolgt, welches mindestens ein Aldehyd umfasst, wobei die Gesamtaldehydkonzentration in einem Bereich von 0,1 bis 100 mM/l liegt, und wobei das Aldehyd durch die allgemeine Formel III beschrieben ist



wobei  $\text{R}^6$  substituiertes oder unsubstituiertes, verzweigtes oder unverzweigtes C1-C10-Alkyl-, C2-C10-Alkenyl-, substituiertes oder unsubstituiertes Aryl- oder Hetaryl- sein kann.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, wobei der Konservierungsschritt durchgeführt wird, bevor die Zellen mit einem Reaktanten, dessen Reaktion durch die Zellen zu katalysieren ist, versetzt werden.

4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei das wässrige Medium eine Gesamtkonzentration an Cyanidverbindungen ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Nitrilen, Blausäure und Cyanidsalzen, enthält, die maximal 10 Mol-% der Gesamtaldehydkonzentration beträgt oder wobei das wässrige Medium keine Zusätze besagter Cyanidverbindungen enthält.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei der Aldehyd ausgewählt ist aus der Gruppe umfassend unsubstituierten Benzaldehyd und substituierte Benzaldehyde.

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei der Mikroorganismus ausgewählt ist aus den Arten der Enterobacteriaceae oder Nocardiaceae Familie.

7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei der Mikroorganismus ausgewählt ist aus den Gruppe der Arten Pseudomonas, Burkholderia, Nocardia.

2 Fig + Sequ.

Acetobacter, Gluconobacter, Corynebacterium, Bravibacterium, Bacillus, Clostridium, Cyanobacter, Staphylococcus, Aerobacter, Alcaligenes, Rhodococcus und Penicillium.

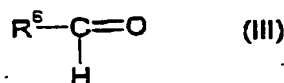
- 5 8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, wobei das Verfahren mit mindestens einem weiteren Verfahren zur Stabilisierung, Konservierung und/oder Lagerung von Enzymen kombiniert wird, wobei besagte Verfahren ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus:
- 10 a) Zusatz von mindestens einem anorganischen Salz in einer Konzentration von mindestens 100 mM;
- b) Zusatz von Metallsalzen, deren Metallkation als prosthetische Gruppe der Nitrilase und/oder Nitrilhydratase fungiert;
- 15 c) Zusatz von Nitrilen und/oder Amiden.
9. Zubereitung zur Konservierung und/oder Lagerung von Mikroorganismen, die mindestens eine Nitrilhydratase- oder Nitrilase-Enzymaktivität aufweisen, wobei die Zubereitung umfasst
- 20 a) mindestens ein Aldehyd mit einer Gesamtaldehydkonzentration in einem Bereich von 0,1 bis 100 mM/l, und
- b) Cyanidverbindungen ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Nitrilen, Blausäure und Cyanidsalzen, in einer Gesamtkonzentration, die maximal 10 Mol-% der Gesamtaldehydkonzentration beträgt.
- 25 10. Zubereitung von Mikroorganismen nach Anspruch 9, wobei besagte Zubereitung keine Zusätze an Cyanidverbindungen enthält.
- 30 11. Verwendung einer Zubereitung von Mikroorganismen nach Anspruch 9 oder 10 zur Herstellung von Nahrungs- oder Futtermitteln, Pharmazeutika oder Feinchemikalien.
- 35 12. Verfahren zur Herstellung von rekombinanten Proteinen, Enzymen oder Feinchemikalien unter Verwendung einer Zubereitung von Mikroorganismen nach Anspruch 9 oder 10 oder einer Präparationen derselben.
- 40 13. Verfahren zur Herstellung von Carbonsäuren und/oder Amide umfassend nachfolgende Schritte:

- 5
- 10
- a) Kultivierung eines Mikroorganismus, der mindestens eine Nitrilase-Enzymaktivität aufweist,
- b) Zugabe eines mindestens eines Aldehydes, wobei die Gesamtaldehydkonzentration in einem Bereich von 0,1 bis 100 mM/l liegt und Lagerung bis zum Einsatz gemäß Schritt (c),
- c) Inkontaktbringen der mit Aldehyd versetzten Zubereitung besagter Mikroorganismen mit mindestens einem Nitril und Umsetzung des besagten Nitrils zu einer Carbonsäure und/oder einem Amid.

14. Verfahren zur Herstellung von Carbonsäuren und/oder Amide umfassend nachfolgende Schritte:

- 15
- 20
- 25
- a) Kultivierung eines Mikroorganismus, der mindestens eine Nitrilhydratase- oder Nitrilase-Enzymaktivität aufweist,
- b) Zugabe eines mindestens eines Aldehydes, wobei die Gesamtaldehydkonzentration in einem Bereich von 0,1 bis 100 mM/l liegt und Lagerung bis zum Einsatz gemäß Schritt (c),
- c) Inkontaktbringen der mit Aldehyd versetzten Zubereitung besagter Mikroorganismen mit mindestens einem Nitril und Umsetzung des besagten Nitrils zu einer Carbonsäure und/oder einem Amid.

wobei der Aldehyd durch die allgemeine Formel III beschrieben ist



30 wobei R<sup>E</sup> substituiertes oder unsubstituiertes, verzweigtes oder unverzweigtes C1-C10-Alkyl-, C2-C10-Alkenyl-, substituiertes oder unsubstituiertes Aryl- oder Hetaryl- sein kann.